

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
24. Januar 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/05922 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: B01D 15/02,  
C07K 1/18, A23J 1/00, 1/14, 3/14, 3/16, 3/18, C07K  
14/415

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Trud-  
eringer Strasse 246, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01997

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Mai 2001 (23.05.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 35 292.8 18. Juli 2000 (18.07.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US*): MPB COLOGNE GMBH, MOLECULAR  
PLANT & PROTEIN BIOTECHNOLOGY [DE/DE];  
Neurather Ring 1, 51063 Köln (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): PETSCH, Dagmar  
[DE/DE]; Erlenweg 11a, 50827 Köln (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR EXTRACTING PROTEINS FROM PLANTS IN PURE FORM

WO 02/05922 A1

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON PROTEINEN AUS PFLANZEN IN REINER FORM

(57) Abstract: The invention relates to a method for extracting a desired native or recombinant protein from a plant in pure form. After extracting a raw extract using an appropriate extraction agent, the desired protein is removed from the raw extract and purified by means of ion-exchange chromatography used in expanded bed technology. The desired protein can be, for example, napin, napin-like 2S albumin, cruciferin, legumin-like 11S globulin or a recombinant scFv antibody.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung eines gewünschten nativen oder rekombinanten Proteins aus einer Pflanze in reiner Form, wobei nach Gewinnung eines Rohextrakts mittels eines geeigneten Extraktionsmittels das gewünschte Protein über Ionenaustausch-Chromatographie in "Expanded bed"-Technologie aus dem Rohextrakt aufgereinigt wird, wobei es sich bei dem gewünschten Protein beispielsweise um Napin, Napin-ähnliches 2S Albumin, Cruciferin, Legumin-ähnliches 11S Globulin oder einen rekombinanten scFv-Antikörper handelt.

### **Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus Pflanzen in reiner Form**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines gewünschten nativen oder rekombinanten Proteins aus einer Pflanze in reiner Form, wobei nach Gewinnung eines Rohextrakts mittels eines geeigneten Extraktionsmittels das gewünschte Protein über Ionenaustausch-Chromatographie in "Expanded bed"-Technologie aus dem Rohextrakt aufgereinigt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Napin, Napin-ähnlichem 2S Albumin, Cruciferin, Legumin-ähnlichem 11S Globulin oder einem rekombinanten scFv-Antikörper verwendet.

Pflanzliche Proteine sind ein bisher kaum genutztes Reservoir nachwachsender Rohstoffe. In besonders großen Mengen fallen pflanzliche Speicherproteine z.B. bei der Ölproduktion aus Raps, Sonnenblumen und anderen Ölpflanzen, oder aus Lupinen bzw. auch bei anderen landwirtschaftlichen Prozessen an. Zumeist werden sie als Abfallprodukt in die Tierfütterung gegeben, da keine reinen und damit technisch verwertbaren Komponenten mit technisch und wirtschaftlich einsetzbaren Methoden erhältlich sind. Andere pflanzliche Proteine kommen in geringeren Mengen vor, sind aber von ihrer Funktionalität her äußerst interessant. Bisher sind allerdings nur wenige pflanzliche Proteine einer wirtschaftlichen Nutzung zugeführt worden. Dies ist u.a. durch aufwendige und damit unwirtschaftliche, aber auch nicht für einen größeren Maßstab geeignete Reinigungsverfahren bedingt. Demgegenüber stehen die äußerst interessanten Eigenschaften, z.B. isolierter pflanzlicher Speicherproteine für verschiedene Anwendungsbereiche. Die beiden vorherrschenden Speicherproteine in Raps, Napin und Cruciferin, die technisch bisher nur als Rohproteinfraktion gewonnen werden konnten, eignen sich z.B. aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften als isolierte Komponenten für Verwendungen als Schäume oder Klebstoffe (Napin) oder für die Folienherstellung (Cruciferin). Weiterhin sind sie aufgrund dieser Eigenschaften

ebenfalls für die Verwendung in der Lebensmittelindustrie geeignet, z.B. als Schäumer und Stabilisatoren.

Bisher wurden lediglich Fällungs- und Extraktionsverfahren eingesetzt, um Rohproteinfraktionen oder angereicherte Verbindungen in technischem Maßstab gewinnen zu können. In diesem Zusammenhang wird auf die US-Patente Nr. 4370267 und 4368151 verwiesen, in denen die Anreicherung einer pflanzlichen Speicherprotein Komponente nach isoelektrischer Fällung durch Extraktion unter geeigneten Bedingungen beschrieben wird. Alle diese Verfahren zeichnen sich durch eine geringe Effizienz aus. Außerdem sind auf diesen Wegen keine Reinkomponenten, sondern lediglich angereicherte Fraktionen erhältlich und zumeist können solche Verfahren nur auf die Gewinnung einer einzigen Komponente aus einem Proteingemisch hin optimiert werden. Reinerer Substanzen konnten bisher lediglich in komplizierten, eine Kombination einer Vielzahl von unterschiedlichen Reinigungsschritten beinhaltenden Prozessen im Labormaßstab gewonnen werden, z.B. 12S Globuline aus Raps durch eine Kombination aus Fällung, Dialyse, Gelchromatographie und Anionenaustausch-Chromatographie.

Weiterhin entwickeln sich durch das "Molecular Farming" (Fremdproteinproduktion in transgenen Pflanzen) neue Anwendungsgebiete für Protein-Werk- und -Wirkstoffe, für die technisch und wirtschaftlich effiziente Reinigungsverfahren, auch in großtechnischem Maßstab, notwendig sind. Während die Produktion von therapeutisch wertvollen Proteinen zumeist hohe Gewinnspannen zuläßt, ist dies für "Massenproteine", z.B. Serumproteine, oder Diagnostika sowie für technisch einsetzbare Proteine nicht der Fall. Hierfür sind demzufolge umsomehr robuste, einfach skalierbare und wirtschaftlich effiziente Verfahren zur Proteinaufreinigung aus pflanzlichem Gewebe notwendig.

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, ein Reinigungsverfahren für Proteine aus Pflanzen zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile der im Stand

der Technik beschriebenen Verfahren nicht aufweist, d.h. vor allem einfach, effizient und in großtechnischem Maßstab durchführbar ist und außerdem gewährleistet, daß die gewünschten Proteine eine hohe Reinheit aufweisen und damit vorzugsweise weitere Reinigungsschritte nicht erforderlich sind.

Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sowohl native als auch rekombinante Proteine aus pflanzlichem Gewebe mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens, das einen Extraktionsschritt und eine nachfolgende selektive Adsorption an Kationen- und Anionenaustauscher in der "Expanded bed"-Technologie umfaßt, mit hoher Effizienz in Reinstoffe aufgetrennt bzw. als Reinstoffe isoliert werden können. Hierbei hat sich gezeigt, daß der Reinheitsgrad der Proteine so hoch ist, daß auch eine wirtschaftlich konkurrenzfähige Produktion neuer Proteinwerkstoffe im Vergleich zu auf fossilen Rohstoffen basierender Kunststoffproduktion ermöglicht wird. Ferner hat sich gezeigt, daß die ansonsten notwendigen Vorbehandlungsschritte, wie Entfettung von ölhaltigem Saatgut, oder Vorfällungsschritte bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht notwendig sind, jedoch gegebenenfalls damit kombiniert werden können. Desweiteren hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren in großtechnischem Maßstab durchgeführt werden kann. Dies wurde u.a. durch die Trennung von Napin (Albumin) und Cruciferin (Globulin) aus Rapssamen gezeigt. Darüberhinaus hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren auch geeignet ist, Fremdproteine, z.B. scFv-Antikörper, aus transgenen Pflanzen zu isolieren und zu reinigen. Es wird auf die nachstehenden Beispiele verwiesen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines gewünschten nativen oder rekombinanten Proteins aus einer Pflanze in reiner Form, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- (a) Aufschluß der Pflanze zur Gewinnung eines Rohextrakts mittels eines geeigneten Extraktionsmittels; und
- (b) Abtrennung des gewünschten Proteins über Ionenaustausch-Chromatographie in "Expanded bed"-Technologie, wobei die Bindung des Rohextrakts bei einem definierten pH-Wert erfolgt.

Vorzugsweise umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren nur die Schritte (a) und (b), d.h. es sind keine Vorbehandlungs- und/oder weitere Reinigungsschritte insbesondere solche, die auf spezifischen physikochemischen Charakteristika des gewünschten Proteins, z.B. Molekulargewicht, Sedimentationskoeffizient, pI-Wert, basieren, notwendig. Vorbehandlungs- und/oder Reinigungsschritte können jedoch gegebenenfalls angefügt werden.

Geeignete Verfahren zum Aufschluß der Pflanze sind dem Fachmann bekannt und dieser kann entsprechend dem gewünschten Protein und der verwendeten Pflanze geeignete Aufschlußverfahren auswählen. Diese können z.B. eine Homogenisierung, wie in einem Mahlwerk oder Mixer, und/oder eine Lyse mit geeigneten Lysemitteln umfassen. Es wird auf die nachstehenden Beispiele verwiesen.

Der Fachmann kennt auch geeignete Extraktionsmittel und wählt diese u.a. entsprechend den bekannten Eigenschaften des gewünschten Proteins aus. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Extraktionsmittel um eine wäßrige Lösung, insbesondere Phosphatpuffer, TRIS-Puffer, MOPS-Puffer oder ein ethanolisches Extraktionsmittel. Gegebenenfalls erfolgt in dem erfindungsgemäßen Verfahren vor oder nach dem Extraktionsschritt ein Denaturierungs- und evtl. Renaturierungsschritt, falls das gewünschte Protein in unlöslicher Form vorliegen sollte. Geeignete Denaturierungsverfahren und Renaturierungsverfahren sind dem Fachmann bekannt und dieser kennt auch die Bedingungen, die erforderlich sind, daß bei diesen Verfahren das gewünschte Protein seine biologische Aktivität nicht verliert bzw. diese wiedergewinnt.

Erfindungsgemäß wird eine Ionenaustausch-Chromatographie in "Expanded bed"-Technologie durchgeführt, um das gewünschte Protein zu reinigen. Bei der "Expanded bed"-Technologie handelt es sich um ein sehr robustes Verfahren, bei dem keine organischen Lösungsmittel oder sonst notwendigen hohen Salzmengen benötigt werden. Außerdem ist die "Expanded bed"-Technologie leicht in den großtechnischen Maßstab übertragbar und benötigt keine aufwendige Apparatechnik. Die Adsorbentien zeigen keine Anzeichen von "Fouling", so daß lange Standzeiten der Chromatographie-Säulen gewährleistet sind. Ergänzend wird auf Straetkvern et al., Bioseparation 7 (1999), 333-345 verwiesen. Erfindungsgemäß wird allerdings die "Expanded bed"-Technologie nicht in Zusammenhang mit Affinitäts-Chromatographie sondern, zum ersten Mal, mit Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Je nach den bekannten Eigenschaften des gewünschten Proteins, z.B. hinsichtlich des pI-Wertes, wird für das erfindungsgemäße Verfahren entweder eine Anionenaustausch- oder Kationenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Von diesen Eigenschaften hängt auch die Wahl des definierten pH-Werts für die Bindung des Proteins an das Chromatographie-Material (Beladung) ab. Der Fachmann wählt z.B. den pH-Wert anhand des pI-Wertes des gewünschten Proteins aus, wobei der pI-Wert entweder aus der Proteinsequenz berechnet oder mittels isoelektrischer Fokussierung bestimmt werden kann. Günstig ist es, wenn der pH-Wert so gewählt wird, daß das gewünschte Protein eine Oberflächenladung mit entgegengesetztem Vorzeichen zur Hauptkontamination hat und der Fachmann wird dann das zur Oberflächenladung des gewünschten Proteins passende Sorbens, d.h. einen Kationen- bzw. Anionenaustauscher auswählen. Jedenfalls ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Einstellung eines definierten pH-Werts, so daß die in dem Extrakt enthaltenen Proteinkomponenten eines Rohproteingemisches selektiv an das vorgegebene Chromatographie-Material gebunden werden können, von entscheidender Bedeutung. Damit ist z.B. die Aufreinigung von zwei oder mehreren Proteinkomponenten, deren pI-Werte sich ausreichend unterscheiden, aus einem Gemisch möglich.

Der hier verwendete Ausdruck "in reiner Form" bedeutet, daß das Protein im wesentlichen frei von Verunreinigungen ist, vorzugsweise eine Reinheit von mindestens 90%, mehr bevorzugt von mindestens 95%, noch mehr bevorzugt von mindestens 98% und am meisten bevorzugt von mindestens 99% aufweist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich für die Reinigung eines gewünschten Proteins aus einer Pflanze jeder beliebigen Pflanzenspezies, d.h. es kann sowohl eine monokotyle als auch eine dikotyle Pflanze sein. Der Ausdruck "Pflanze" umfaßt auch Gramineen, Chenopodien, Leguminosen, Brasicaceen, Solanaceen, Pilze, Moose und Algen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, z.B. um Pflanzen, wie Weizen, Gerste, Reis, Mais, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Raps, Senf, Rübsen, Flachs, Erbse, Bohne, Lupine, Tabak und Kartoffel.

Für die Gewinnung des Proteins kann jedes Pflanzenteil bzw. Gewebe der Pflanze verwendet werden, wobei die Auswahl entsprechend der unterschiedlichen Konzentration des gewünschten Proteins in den einzelnen Pflanzenteilen bzw. -

Geweben erfolgt. Vorzugsweise wird das gewünschte Protein aus Samen, Blättern, Knollen, Wurzelstücken, Sämlingen, Stecklingen, etc. gewonnen, wobei Kartoffelknollen besonders bevorzugt sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das gewünschte Protein aus einem Speicherproteingemisch gewonnen. Beispiele für Speicherproteine, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert und gereinigt werden können, sind Napin, Cruciferin, Patatin, Legumin und Vicillin..

In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Bindung des gewünschten Proteins an das Ionenaustauschermaterial bei einem pH-Wert von 7,5 bis 9, am meisten bevorzugt erfolgt eine Elution des gewünschten Proteins mit einem NaCl enthaltenden Puffer definierter Molarität oder mittels eines NaCl-Gradienten. Der

Fachmann kann die optimalen Elutionsbedingungen anhand der bekannten Charakteristika des gewünschten Proteins und/oder durch Vorversuche im Labormaßstab ermitteln.

Entsprechend des pI-Wertes des gewünschten Proteins wählt der Fachmann eine (a) Anionenaustausch-Chromatographie oder (b) Kationenaustausch-Chromatographie, wobei für (a) vorzugsweise ein Chromatographiematerial mit den Eigenschaften von Streamline DEAE™ oder Streamline QXL (Amersham Pharmacia, Upsala, Schweden) gewählt wird und für (b) vorzugsweise Streamline SP XL™ (Amersham Pharmacia).

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt u.a. die Isolierung und Reinigung von nativen Proteinen, z.B. Napin, Napin-ähnliche 2S Albumin-Proteine, Cruciferin und Legumin-ähnliche 11S Globulin-Proteine aus pflanzlichen Samen. Bei den Napin-ähnlichen Proteinen handelt es sich um Proteine mit einem isoelektrischen Punkt, der bei 8,0 oder darüber liegt, einer Molmasse zwischen 10 und 20 kDa und einer Zusammensetzung aus zwei heterodimeren Untereinheiten ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten), die über eine oder mehrere Disulfidbrücken verknüpft sind. Legumin-ähnliche 11S Globulin-Proteine sind durch einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,0 und 8,0 charakterisiert, einer Molmasse zwischen 250 und 400 kD und einer Zusammensetzung als Hexamere aus Untereinheiten, die jeweils aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt sind, die wiederum über eine oder mehrere Disulfidbrücken verknüpft sind. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind somit die gewünschten zu isolierenden Proteine Napin, Napin-ähnliche 2S Albumin-Proteine, Cruciferin und Legumin-ähnliche 11S Globuline, die z.B. unter den in dem nachstehenden Beispiel 1 angegebenen Bedingungen aus nicht-entfettetem Rapssamen isoliert und gereinigt werden können. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können z.B. die Proteine Napin und Cruciferin aus demselben Rohextrakt isoliert und aufgereinigt werden, wobei durch Variation des pH-Wertes die Oberflächenladungen der Proteine so eingestellt werden, daß jeweils nur eine der beiden Hauptkomponenten (Napin und Cruciferin) eines



wässrigen Rapssamenextraktes selektiv mit An- bzw. Kationen-austauschern wechselwirkt. Somit kann eine effiziente adsorptionschromatographische Trennung erreicht werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt alternativ auch die Isolierung und Reinigung von rekombinanten Proteinen, vorzugsweise von scFv-Antikörpern, die z.B. wie in den nachstehenden Beispielen 2 bis 4 angegeben, isoliert und gereinigt werden können, bei denen ein wässriger Extrakt von Kartoffelblättern hergestellt wurde, der dann ohne Fällungs- oder andere Vorreinigungsschritte in ein "Expanded bed"-Verfahren eingeleitet wurde.

Insgesamt gesehen zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber herkömmlichen Verfahren in vielerlei Hinsicht aus. Vor allem sind seine Einfachheit, technische Skalierbarkeit ohne hohen Apparate-Aufwand, die Robustheit der Säulenmaterialien, der mögliche Verzicht auf eine Entölung ölhaltiger Pflanzengewebe, wie Samen, und auf umfangreiche Vorbehandlungsschritte vor dem Auftrag des wässrigen Extrakts auf das Chromatographie-Material und die erzielbare hohe Reinheit der nativen bzw. rekombinanten Proteine und damit deren Verfügbarkeit zu wirtschaftlich günstigen Bedingungen. Desweiteren kann die Reihenfolge der Isolierung von mehreren Proteinen aus demselben Proteingemisch unter Beachtung der physikochemischen Charakteristika der jeweiligen Proteine beliebig gewählt werden.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

##### Figur 1: Ergebnisse der SDS-PAGE des nach Beispiel 1(A) gereinigten Napin

Es wurde ein 10 % Novex-Gel der Fa. Invitrogen (Groningen, NL) eingesetzt; Laufpuffer: MES, Färbung: Coomaassie Brilliant Blue. In den Spuren 1 und 2 sind die Waschfunktionen mit 150 mM NaCl von der Streamline SP XL<sup>TM</sup>-Säule gezeigt. Spur 3 ist der SDS-7 Molekulargewichtsmarker der Fa. Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Die Spuren 4-7 zeigen gereinigtes Napin in den

Elutionsfraktionen (Peakspitze und Peakschulter).

Figur 2: Ergebnisse der SDS-PAGE des nach Beispiel 1(B) gereinigten Cruciferin

Es wurde ein 10% Novex-Gel der Fa. Invitrogen (Groningen, NL) eingesetzt; Laufpuffer: MES, Färbung: Coomaassie Brilliant Blue. Die Spur 1 zeigt den Durchlauf der Streamline DEAE Säule, die Spur 2 ist der SDS-7 Molekulargewichtsmarker der Fa. Sigma (Deisenhofen). Die Spuren 3-5 zeigen gereinigtes Cruciferin in den Elutionsfraktionen (Peakspitze und Peakschulter).

Figur 3: Ergebnisse der SDS-PAGE des nach Beispiel 2 gereinigten scFv-Antikörpers

SDS-Page aus transgenen Kartoffelblättern. Es wurde ein 10 % Novex-Gel der Fa. Invitrogen (Groningen, NL) eingesetzt; Laufpuffer: MES, Färbung: Silber. Die Spur 1 zeigt den Blattextrakt, die Spur 2 den Durchlauf der Streamline QXL Säule, die Spur 3 das Eluat aus der Streamline Q XL Säule, die Spur 4 ist die Waschfraktion mit 0,5 M NaCl. Die Spur 5 ist der SDS-7 Molekulargewichtsmarker der Fa. Sigma (Deisenhofen).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1:      Aufreinigung von Napin und Cruciferin aus  
nicht-entöltem Rapssamen**

(A) Extraktion

Rapssamen (100 g) wurden in einem Mahlwerk auf mittlerer Mahlstärke vermahlen und mit der fünffachen Menge an Puffer (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5) extrahiert. Dazu wurde die Mischung etwa 30 min. gerührt und anschließend wurden die festen Anteile abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands in ein Sammelgefäß wurde der Niederschlag mit der gleichen Puffermenge wie zuvor ein zweites Mal extrahiert und wie vorstehend beschrieben weiterverarbeitet. Die vereinigten Flüssigphasen wurden auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und dann direkt der Fließbettadsorption ("Expanded bed"-Technologie) zugeführt.

(B): Gewinnung von Napin

Aus dem Rapssamenextrakt wurde zunächst Napin an einen starken Kationenaustauscher (Streamline SP XL™; Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) adsorbiert. Dazu wurde die Flüssigphase mit einem Fluß von 200 cm/Std. durch das äquilibrierte Fließbett gepumpt. Es wurde eine Streamline 25 Säule mit einem Bett von  $2,5 \times 11,5 \text{ cm} = 56,5 \text{ ml}$  verwendet. Anschließend wurde im expandierten Zustand (durch das Ausströmen dehnt sich das Bett aus, bei 200 cm/h ca. zweifach) mit 10 Säulenvolumina Ladungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,5) gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im sedimentierten Zustand des Betts durchgeführt. Das Bett wird jetzt nicht mehr von unten, sondern von oben angeströmt, so daß es auf die ursprüngliche Betthöhe von 11,5 cm zurückkehrt. Zunächst wurde mit 3 Säulenvolumina Waschpuffer (20 mM Phosphat-Puffer, pH-Wert 7,5, 0,15 M NaCl) gewaschen, danach erfolgte die Elution mit Elutionspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, 0,5 M NaCl). Das damit gereinigte Napin wurde mit dem Fachmann bekannten Verfahren entsalzt und lyophilisiert. Die Säule wurde anschließend durch Waschen mit je 3 Säulenvolumina 0,2 M NaOH und 0,2 M HCl regeneriert.

(C): Gewinnung von Cruciferin

Aus dem Durchlauf der Napin-Adsorption aus (B) wurde das Cruciferin durch "Expanded bed"-Adsorption gewonnen. Die Durchlauffraktion aus (B) wurde auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und an einen Anionenaustauscher (Streamline DEAE™; Amersham Pharmacia) adsorbiert. Dazu wurde die Flüssigphase mit einem Fluß von 200 cm/Std. durch das äquilibrierte Fließbett gepumpt (Säulenvolumen:  $2,5 \times 11,5 \text{ cm} = 56,5 \text{ ml}$ ). Anschließend wurde im expandierten Zustand mit 10 Säulenvolumina Ladungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 8,5) gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im sedimentierten Zustand des Betts durchgeführt. Zunächst wurde mit 3 Säulenvolumina Ladungspuffer gewaschen, danach erfolgte die Elution mit Elutionspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, 0,2 M NaCl). Das damit gereinigte Cruciferin wurde mit dem Fachmann bekannten Verfahren entsalzt und lyophilisiert. Die Säule wurde

anschließend durch Waschen mit je 3 Säulenvolumina 0,5 M NaCl und 0,2 M HCl regeneriert.

(D): Bestimmung der Reinheit der in (B) und (C) gewonnenen Proteine

Die gereinigten Speicherproteine Napin und Cruciferin wurden einer Reinheitsanalyse mittels SDS-PAGE unterzogen (siehe Figur 1 für Napin und Figur 2 für Cruciferin). In beiden Fällen beträgt die Reinheit der Proteine 99%.

**Beispiel 2: Isolierung von rekombinanten scFv-Antikörpern aus transgenen Kartoffelblättern**

Transgene, mit einem einen scFv-Antikörper kodierenden Vektor transformierte Kartoffelblätter wurden im Verhältnis 1:1 (Masse:Volumen) mit 20 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0) gemischt und in einem "Warring-Blender" 3 x 6 Sekunden homogenisiert. Der erhaltene grüne Saft wurde durch Zentrifugation (15 min, 10000 UpM) von Partikeln befreit, auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit einem Fluß von 200 cm/Std. durch das äquilibrierte (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0) Fließbett ("Expanded bed") gepumpt (Säulenvolumen: 2,5 x 11,5 cm = 56,5 ml). Die Adsorption erfolgte an Streamline Q XL™ (Amersham Pharmacia). Nach dem Beladen wurde im expandierten Zustand mit 10 Säulenvolumina Ladungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0) und 3 Säulenvolumina Ladungspuffer im sedimentierten Zustand des Betts gewaschen, danach erfolgte die Elution der scFv-Antikörper unter Verwendung eines linearen Salzgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in 20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0. Die gereinigten Antikörper wurden mit dem Fachmann bekannten Verfahren entsalzt und lyophilisiert. Über SDS-PAGE konnte nachgewiesen werden, daß die Hauptproteinkomponente der Blätter, Ribulosebiphosphat-Carboxylase, vollständig in einem Schritt abgetrennt und Antikörper mit einer Reinheit von 90% erhalten werden konnten (Figur 3).

**Beispiel 3: Isolierung von rekombinanten scFv-Antikörpern aus transgenem Rapssamen**

Rapssamen (100 g) wurden wie in Beispiel 1 beschrieben homoge-

nisiert und mit der fünffachen Menge an Puffer (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5) extrahiert. Dazu wurde die Suspension 15 Min. gerührt. Nach Dekantieren der Flüssigphase wurde die Extraktion in der beschriebenen Weise einmal wiederholt. In den vereinigten Flüssigphasen wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und diese wurden dann mit einem Fluß von 200 cm/Std. durch das äquilibrierte (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5) Fließbett ("Expanded bed") gepumpt (Säulenvolumen: 2,5 x 11,5 cm = 56,5 ml). Die Adsorption erfolgte an Streamline Q XL™ (Amersham Pharmacia). Nach dem Beladen wurde im expandierten Zustand mit 10 Säulenvolumina Ladungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,0) und 3 Säulenvolumina Ladungspuffer im sedimentierten Zustand des Betts gewaschen, danach erfolgte die Elution der scFv-Antikörper mit 6 Säulenvolumina Waschpuffer (Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5) mit 0,5 M NaCl. Die hochgereinigten scFv-Antikörper wurden mit dem Fachmann bekannten Verfahren entsalzt und lyophilisiert.

**Beispiel 4: Isolierung von rekombinanten scFv-Antikörpern aus entfettetem transgenem Rapssamen**

Rapssamen (100 g) wurden mit dem Fachmann bekannten Verfahren zerkleinert und schonend mit Hexan entfettet. Nach der Hexan-Behandlung wurden die Samen pulverisiert. Das Samenpulver wurde mit der fünffachen Masse an Puffer (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5) extrahiert. Dazu wurde die Suspension 15 Min. gerührt. Nach Dekantieren der Flüssigphase wurde die Extraktion in der beschriebenen Weise einmal wiederholt. In den vereinigten Flüssigphasen wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und dann mit einem Fluß von 200 cm/Std. durch das äquilibrierte (20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5) Fließbett ("Expanded bed") gepumpt (Säulenvolumen: 2,5 x 11,5 cm = 56,5 ml). Die Adsorption erfolgte an Streamline Q XL™ (Amersham Pharmacia). Nach dem Beladen wurde im expandierten Zustand mit 10 Säulenvolumina Ladungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,5) und 3 Säulenvolumina Ladungspuffer im sedimentierten Zustand des Betts gewaschen, danach erfolgte die Elution der scFv-Antikörper mit 6 Säulenvolumina Ladungspuffer mit 0,5 M NaCl. Die hochgereinigten scFv-Antikörper wurden mit dem Fachmann

bekannten Verfahren entsalzt und lyophilisiert.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Gewinnung eines gewünschten nativen oder rekombinanten Proteins aus einer Pflanze in reiner Form, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
  - (a) Aufschluß der Pflanze zur Gewinnung eines Rohextrakts mittels eines geeigneten Extraktionsmittels; und
  - (b) Abtrennung des gewünschten Proteins über Ionenaustausch-Chromatographie in "Expanded-Bed"-Technologie, wobei die Bindung des Rohextrakts bei einem definierten pH-Wert erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Pflanze eine Graminee, eine Chenopodie, eine Leguminose, eine Brassicacee, eine Solanacee, ein Pilz, ein Moos oder eine Alge ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Pflanze Weizen, Gerste, Reis, Mais, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Raps, Senf, Rüben, Flachs, Erbse, Bohne, Lupine, Tabak oder Kartoffel ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, wobei das gewünschte Protein aus Samen, Blättern, Knollen, Wurzelstöcken, Sämlingen oder Stecklingen gewonnen wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das gewünschte Protein aus einem Speicherproteingemisch gewonnen wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Extraktionsmittel Phosphatpuffer, TRIS-Puffer, Mops-Puffer oder ein ethanolisches Extraktionsmittel ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei bei Schritt (b) der pH-Wert im Bereich von 7,5 bis 9,0 liegt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei in Schritt (b) die Elution des gewünschten Proteins mit einem NaCl enthaltenden Puffer definierter Molarität, mittels eines NaCl-Gradienten oder durch Veränderung des pH-Wertes erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Ionenaustausch-Chromatographie eine Anionenaustausch-Chromatographie ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Material für die Anionenaustausch-Chromatographie Streamline DEAE™ oder Streamline QXL ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Ionenaustausch-Chromatographie eine Kationenaustausch-Chromatographie ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Material für die Kationenaustausch-Chromatographie Streamline SP XL™ ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 12, wobei das gewünschte Protein Napin, Napin-ähnliches 2S Albumin, Cruciferin oder Legumin-ähnliches 11S Globulin ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 12, wobei das gewünschte Protein ein scFv-Antikörper ist.



1/3

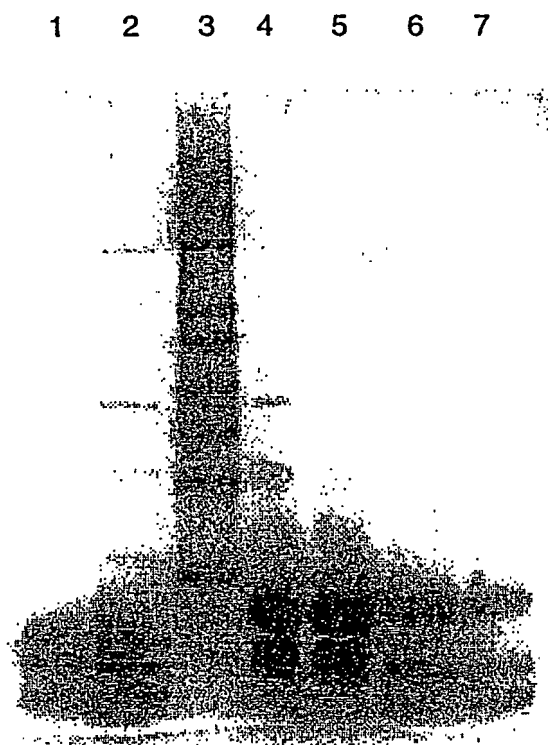


Fig. 1

2/3

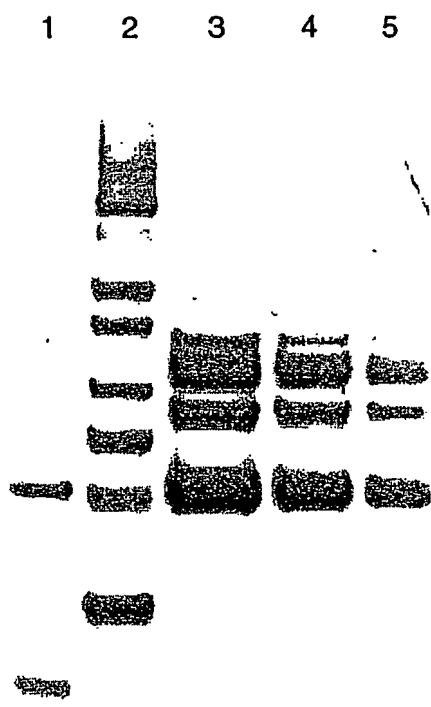


Fig. 2

3/3



Fig. 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Application No

PCT/DE 01/01997

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01D15/02 C07K1/18 A23J1/00 A23J1/14 A23J3/14  
 A23J3/16 A23J3/18 C07K14/415

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01D C07K A23J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERTRAND O ET AL: "Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 822, no. 1, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 19-28, XP004140655 ISSN: 0021-9673 page 19, paragraph 1 page 20, paragraphs 1,2,4 -page 21, paragraph 3 page 22, paragraph 2 page 23, paragraphs 4,5; figure 3	1,6-10
A	---	2-5,13, 14
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 2001

Date of mailing of the international search report

05/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tallgren, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/DE 01/01997

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 65586 A (UPFRONT CHROMATOGRAPHY AS ;OLSEN BRIAN A (DK); ZAFIRAKOS ELIAS (DK) 23 December 1999 (1999-12-23) claims 1,4; examples 2,3 page 1, line 4-7 ---	1-14
A	WO 97 17132 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BERG HANS (SE); CARLSSON MATS (SE); LINDSTRO) 15 May 1997 (1997-05-15) claims 1,2; example 1 page 3, line 5-12 page 8, line 24 -page 10, line 9 ---	1-14
A	JOHANSSON H J ET AL: "Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from E. coli using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 48, no. 1, 18 July 1996 (1996-07-18), pages 9-14, XP004037029 ISSN: 0168-1656 page 9, paragraph 1 page 10, paragraph 5 -page 11, paragraph 1 page 12, paragraph 3 -page 14, paragraph 1 ---	1-14
P,A	WO 01 19989 A (BERMEJO LOURDES L ;MISTRY FIROZ RUSTOM (US); MADSEN JOHN (US); SIM) 22 March 2001 (2001-03-22) claims 1,3,11,13,14,19; example 3 page 12, line 7 -page 13, line 24 page 21, line 26 -page 22, line 20 -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/DE 01/01997

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9965586	A	23-12-1999	AU 4498499 A	05-01-2000
			WO 9965586 A2	23-12-1999
			EP 1087828 A2	04-04-2001
WO 9717132	A	15-05-1997	AU 719422 B2	11-05-2000
			AU 7593196 A	29-05-1997
			CA 2236875 A1	15-05-1997
			EP 0861119 A1	02-09-1998
			JP 2000500063 T	11-01-2000
			WO 9717132 A1	15-05-1997
WO 0119989	A	22-03-2001	AU 7579600 A	17-04-2001
			WO 0119989 A2	22-03-2001

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int les Aktenzeichen

PCT/DE 01/01997

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01D15/02 C07K1/18 A23J1/00 A23J1/14 A23J3/14  
A23J3/16 A23J3/18 C07K14/415

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01D C07K A23J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BERTRAND O ET AL: "Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, Bd. 822, Nr. 1, 25. September 1998 (1998-09-25), Seiten 19-28, XP004140655 ISSN: 0021-9673 Seite 19, Absatz 1 Seite 20, Absätze 1,2,4 -Seite 21, Absatz 3 Seite 22, Absatz 2 Seite 23, Absätze 4,5; Abbildung 3	1,6-10          2-5,13, 14
A	---	---

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tallgren, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

II les Aktenzeichen

PCT/DE 01/01997

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 65586 A (UPFRONT CHROMATOGRAPHY AS ;OLSEN BRIAN A (DK); ZAFIRAKOS ELIAS (DK) 23. Dezember 1999 (1999-12-23) Ansprüche 1,4; Beispiele 2,3 Seite 1, Zeile 4-7 ----	1-14
A	WO 97 17132 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BERG HANS (SE); CARLSSON MATS (SE); LINDSTRO) 15. Mai 1997 (1997-05-15) Ansprüche 1,2; Beispiel 1 Seite 3, Zeile 5-12 Seite 8, Zeile 24 -Seite 10, Zeile 9 ----	1-14
A	JOHANSSON H J ET AL: "Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from E. coli using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 48, Nr. 1, 18. Juli 1996 (1996-07-18), Seiten 9-14, XP004037029 ISSN: 0168-1656 Seite 9, Absatz 1 Seite 10, Absatz 5 -Seite 11, Absatz 1 Seite 12, Absatz 3 -Seite 14, Absatz 1 ----	1-14
P,A	WO 01 19989 A (BERMEJO LOURDES L ;MISTRY FIROZ RUSTOM (US); MADSEN JOHN (US); SIM) 22. März 2001 (2001-03-22) Ansprüche 1,3,11,13,14,19; Beispiel 3 Seite 12, Zeile 7 -Seite 13, Zeile 24 Seite 21, Zeile 26 -Seite 22, Zeile 20 -----	1-14



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01997

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9965586 A	23-12-1999	AU 4498499 A	05-01-2000
		WO 9965586 A2	23-12-1999
		EP 1087828 A2	04-04-2001
WO 9717132 A	15-05-1997	AU 719422 B2	11-05-2000
		AU 7593196 A	29-05-1997
		CA 2236875 A1	15-05-1997
		EP 0861119 A1	02-09-1998
		JP 2000500063 T	11-01-2000
		WO 9717132 A1	15-05-1997
WO 0119989 A	22-03-2001	AU 7579600 A	17-04-2001
		WO 0119989 A2	22-03-2001